

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

学 位 論 文 題 目

ステロイドスルファターゼ阻害剤 KW-2581 の Jet mill 粉砕における分解メカニズムに関する研究

青木 匡

論文要旨

Steroid Sulfatase (STS)遺伝子は、X連鎖性劣性魚鱗癬の原因遺伝子として知られており、本疾患は基本的に男性にのみ約 6000 人に 1 人の割合で発生している劣性遺伝疾患である。このように遺伝性疾患の原因遺伝子として同定された STS ではあるが、一方で女性ホルモン合成においても重要な役割が知られている。

STS 阻害剤である KW-2581(17-diisopropylcarbamoyl-1,3,5(10),16-estratetraen-3-yl sulfamate)は、エストロゲン生合成酵素の 1 つである STS を阻害することによりエストロゲンの供給を遮断し、ホルモン依存性腫瘍の増殖を抑制するコンセプトの制癌剤であり、対象疾患としてはホルモン依存性乳癌、子宮内膜癌等が考えられている。KW-2581 は強力な STS 阻害活性と高い酵素阻害選択性を有する魅力的な化合物であるが、水への溶解度が約 0.1 ng/mL と非常に難溶性であることから、微細化による溶解性・吸収性の向上を目的に粉砕することが決定された。医薬品原薬の粉砕法としては様々な手法が知られているが、KW-2581 原薬の粉砕方法としては、乾式粉砕法の中でも粉砕による温度上昇が少なく、比較的ソフトな粉砕法として知られる Jet mill 粉砕が採用された。海外の粉砕業務受託機関にて、KW-2581 につき Jet mill 粉砕を実施したところ、予想に反し、未粉砕品に比べて品質レベルの低下(水分および類縁物質の増加)が確認された。Jet mill 粉砕とは、ノズルから噴射される音速レベルの高圧気流(空気または窒素ガス)を粒子に衝突させ、粒子同士の衝撃または粒子と器壁との衝突により、粒子を 2~3 ミクロンレベルまで微粒子化する粉砕のことである。ボール等の粉砕メディアを用いない Jet mill 粉砕において、KW-2581 では予期せぬ分解が生じたことから、本品質低下の原因解明を目的に、粉砕品および未粉砕品につき、KW-2581 原薬の粉末 X 線回折を用いた結晶形の確認および結晶化度の測定、吸湿性試験および各種苛酷試験を実施した。また、分解メカニズムの解明を目的に、KW-2581 Jet mill 粉砕品の苛酷試験(70°C、1 ヶ月)において観測された主な分解物につき、分光学的および合成化学的手法によりそれらの構造決定を実施した。

一般的に粉砕などのメカノケミカルなエネルギーにより結晶転移が生じ、物性に変化が生じることが知られている。そこで KW-2581 原薬の Jet mill 粉砕品および未粉砕品につき粉末 X 線回折の測定を実施した。その結果、粉砕による結晶形の変化は認められなかったが、結晶化度の顕著な低下が観測された。一般的にアモルファスは結晶に比べて不安定であり、また吸湿性を始めとする各種物性も結晶とは異なることが知られている。そこで粉砕レベルおよび含水量の異なる各種 KW-2581 原薬につき、苛酷試験(温度 70°C および湿度 93%RH)および吸湿性試験(93%RH)を実施した。その結果、KW-2581 原薬は粉砕の有無に関わらず、吸湿性はほとんどないことが判明した。一方苛酷試験の結果、いずれの試料においても加湿条件では安定であったのに対し、加温条件では類縁物質の増加が確認され、特に水分量の多い Jet mill 粉砕品での増加(0.68%→3.60%)が顕著であった。主な分解物は、相対保持時間 0.15~0.51 の化合物群、相対保持時間 0.76、0.94 および 1.18 の化合物であり、Jet mill 粉砕後に観測され

たこれらの分解物がさらに増加していることが確認された(**Figure 1**)。また、減圧乾燥品においては分解物の生成が抑えられていることから、水分の存在が粉碎品を不安定化する要因の一つであることが示唆された。

KW-2581 の分解メカニズムを明らかにする目的で、最も分解が顕著であった Jet mill 粉碎品の苛酷試験(70°C) 1 ヶ月保存の試料を用いて、分解物の構造決定を実施した。UV スペクトルおよび MS スペクトルの解析により、主な分解物は、原薬の脱水素体および加水分解体である 9(11)-dehydro-SDCE および HDCE や、相対保持時間 0.34~0.48 の分解物、KW-2581 の 6 位オキシ誘導体(D-1)および 16、17 位エポキシ体(D-2)を始めとする各種酸化体であることが示唆された。そこでこれら分解物につき、合成化学的手法による構造確認を実施した。

D-1 の構造決定 : D-1 の化学構造を確認するため、PCC 酸化を用いた KW-2581 のベンジル位選択的な酸化を実施した。多数の生成物が確認されたが、D-1 と同じ保持時間の化合物が主生成物として得られた。そこで本主生成物の LC/MS を用いた MS スペクトルおよび LC/DAD を用いた UV スペクトルを解析した結果、質量数は KW-2581 のオキシ誘導体に相当する 474 であり、また UV スペクトルは、D-1 のスペクトルパターンと一致することが確認された。また本主生成物を単離し、NMR スペクトルによる構造解析を実施した結果、推定構造と矛盾のない結果が得られ、D-1 は KW-2581 の 6 位オキシ誘導体と決定された。

D-2 の構造決定 : D-2 の化学構造を確認するため、*m*-CPBA 酸化を用いた KW-2581 のエポキシ化を実施した。D-2 と同じ保持時間の化合物が主生成物として得られ、本主生成物の MS スペクトル解析の結果、質量数は KW-2581 のエポキシドに相当する 476 であることが確認された。また本主生成物を単離し、NMR スペクトルによる構造解析を実施した結果、推定構造と矛盾のない結果が得られ、D-2 は KW-2581 の 16、17 位エポキシ体と決定された。なお、D-2 は KW-2581 と同様の UV スペクトルパターンを示したが、これは KW-2581 の立体構造に起因すると考えられる。KW-2581 の α 、 β 不飽和アミドの *K* 吸収帯は元々明瞭ではなく、これはかさ高いジイソプロピルアミド基と 16 位ビニルプロトンとの立体反発により、エノン部分の共平面性が崩れているためと考えられた。そこで KW-2581 の立体構造を確認するため、粉末 X 線回折法による結晶構造解析を実施した。大型放射光施設 SPring-8 にて取得した生データを粉末結晶構造解析プログラム DASH に読み込ませ、シミュレーテッドアニリング法による初期構造の決定を行った後に、リートベルト法による構造精密化を実施した。得られた KW-2581 の結晶構造を確認した結果、エノン部分の共平面性の崩れが確認された。

相対保持時間 0.34~0.48 の分解物の構造推定 : MS および UV スペクトルの解析より、相対保持時間 0.34~0.48 の多数の分解物は、KW-2581 の種々の酸化体(エポキシ体、水酸化体、オキシ体など)であると考えられた。このような非選択的で多数の酸化体を合成的に得るために、KW-2581 への Fenton 酸化を検討した。Fenton 酸化は、その反応機構が未だ正確には解明されていないが、一般的には二価の鉄イオンによる過酸化水素の一電子還元により生成するヒドロキシルラジカルがイニシエーターとなり、次々にラジカル反応が進行するため、非選択的に様々な酸化体が得られることで知られている ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$)。KW-2581 の Fenton 酸化で得られた生成物と苛酷条件(70°C) 1 ヶ月保存試料中に観測された分解物(相対保持時間 0.34~0.48)を比較した結果、これらのプロファイルは一致していないものの、両方のクロマトグラムにおける主なピークは、同じ相対保持時間(0.34、0.38、0.42 および

0.48)および同じ質量数を有することが確認された(**Figure 2**)。

葛谷らはステンレス製などの金属製の粉碎容器を用いる低分子化合物の振動ボールミル処理において、金属表面からの固相-電子移動反応により、メカノラジカルが生成することを実験的に証明している。また彼らは、市販の錠剤を室温大気中において自動めくう製乳鉢で粉碎した結果、数種の医薬品においてメカノラジカルが生成することを確認している。これらの知見および Fenton 酸化を用いたモデル実験の結果を基に考察した結果、KW-2581 の Jet mill 粉碎で観測された分解物(相対保持時間 0.34~0.48)は、ヒドロキシラジカルまたはステンレス容器の表面における固相-電子移動反応から生じたメカノラジカルが関与する空気酸化で生成した KW-2581 の様々な酸化体と推定された。

各種検討の結果、KW-2581 原薬の Jet mill 粉碎による品質低下の原因は、粉碎工程特異的な結晶化度の低下と吸湿、およびステンレス容器の表面における固相-電子移動反応で生じたラジカルが関与する空気酸化と推定された。事実 KW-2581 の Jet mill 粉碎品は、減圧乾燥により分解が抑えられることが確認されている。Jet mill 粉碎後の乾燥工程の追加は、原薬粉碎品の保存中の品質劣化を抑える点で極めて効果的であることから、KW-2581 原薬の分解を制御するための Quality by Design アプローチとして非常に有用である。また本研究は、医薬品の Jet mill 粉碎中に発生した分解のメカニズム解明に向けて有用な知見を与えるものであり、医薬品の Jet mill 粉碎における品質低下の発生率低減を目的とした、さらなるアイデアの創出につながるものと期待される。

対象論文

Masashi Aoki, Hikaru Nishimura, Akihiro Mimura, Shoji Kita, Tohru Yasuzawa, Katsuhide Terada. Identification of the Degradation Products of the Steroid Sulfatase Inhibitor KW-2581 in Jet Mill-Micronized Powder. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 102(6):1760-1772 (2013)

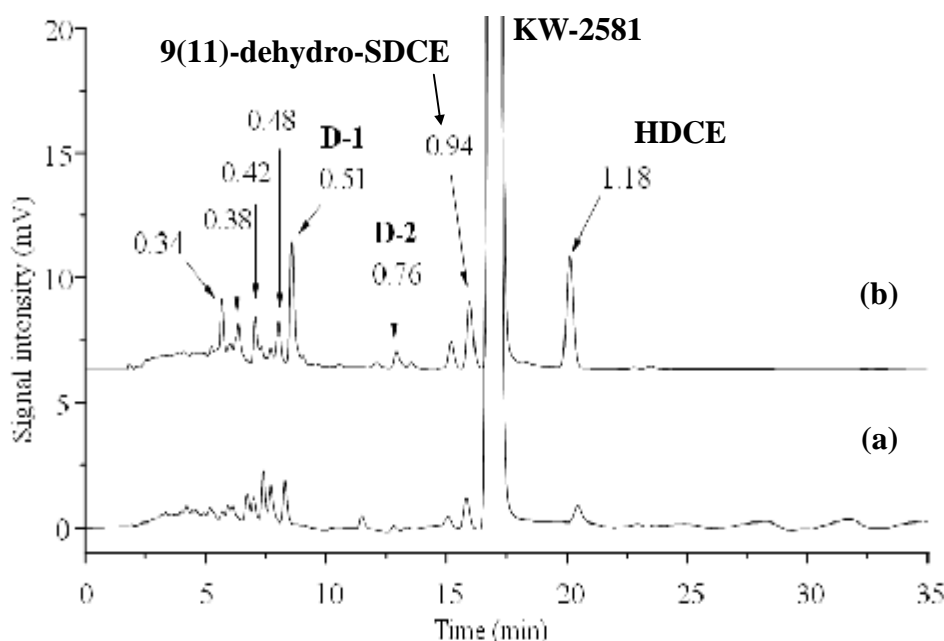


Figure 1. HPLC chromatograms of jet mill-micronized KW-2581 stored at 70°C (numbers show relative retention time) (a) before storage and (b) after 1 month.

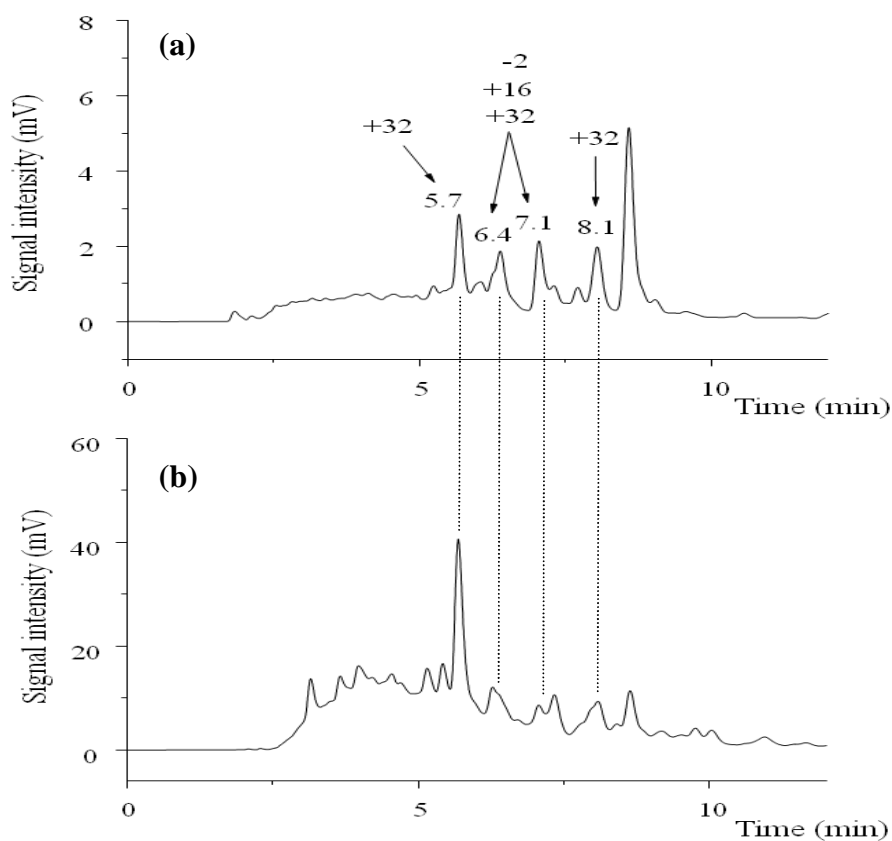


Figure 2. HPLC chromatograms of (a) the stress test, 70°C, after 1 month, and (b) the Fenton oxidation for KW-2581 (decimals show retention time and signed integers show mass difference of the degradation product to KW-2581).

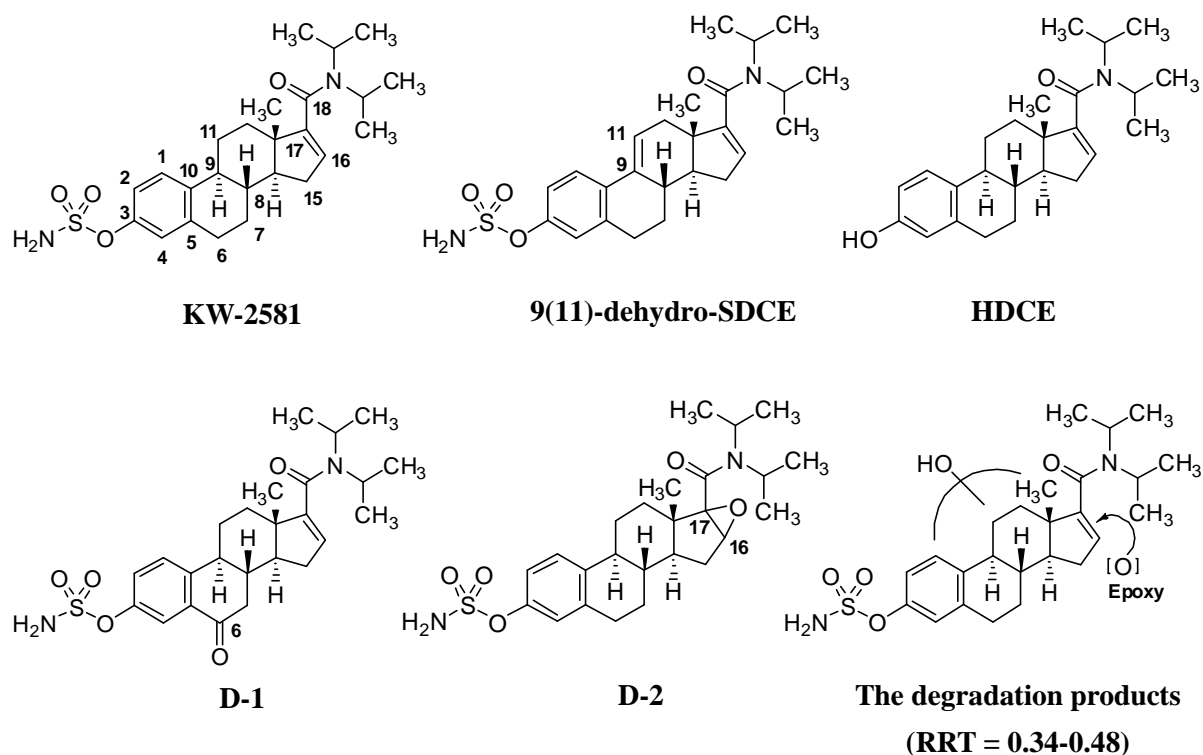


Figure 3. Chemical structures of KW-2581 and related compounds.

論文題目：ステロイドスルファターゼ阻害薬 KW-2581 の Jet mill

粉碎における分解メカニズムに関する研究

論文提出者：青木 匡

現在開発中の KW-2581 は、高い Steroid Sulfatase 阻害活性と酵素阻害選択性を有する化合物として期待されているが、水への溶解度が約 0.1ng/nL と非常に難溶性であることから溶解性の改善が必要とされた。そこで微細化による溶解性・吸収性の向上を目的として比較的緩和な粉碎手法として知られているジェットミルで粉碎を行った。その結果、ジェットミル粉碎により KW-2581 の品質低下が認められた。そこで品質低下の原因を解明するため、粉碎による結晶形、結晶化度などの物性評価、温度・湿度などの過酷条件下での分解物の分光学的および合成化学的手法による構造決定を行った。

これらの結果をもとに KW-2581 のジェットミル粉碎による分解メカニズムについて検討を行い、粉碎で生じた分解が粉碎による結晶化度の低下と吸湿に加えてジェット気流による衝突で生じたメカノラジカルの生成、または容器表面における固相 - 電子移動反応で生じたラジカルの生成による酸化分解反応であることを解明した。

本論文は 2 部から成る。以下それぞれの内容について述べる。

1 KW-2581 の未粉碎品および各種粉碎品における品質および物性の比較

ジェットミル粉碎処理を行うと KW-2581 の水分含量、類縁物質総量とも顕著に増加し、品質の低下が認められた。類縁物質としては、KW-2581 の加水分解体の HDCE、9(11)-デヒドロ SDCE、相対保持時間 0.15-0.51 に多数の化合物群が認められた。また、粉末 X 線回折による結晶化度の低下も認められた。高温・高湿度過酷条件下での保存では分解物の増加が認められ、減圧乾燥条件下では分解物の生成が抑えられることから水分の存在が粉碎品を不安定化させる要因の一つと推察された。

2 KW-2581 の Jet mill 粉碎で生じた分解物の構造決定

KW-2581 のジェットミル粉碎品を過酷条件(70°C)下で 1 カ月保存した試料について、エレクトロスプレーイオン化法により LC/MS 分析を行った。また、フラグメント情報は、インソース衝突誘起解離法により取得した。さらに、主な分解物の交換性プロトンの数を調べるため、重水を用いた水素重水素交換質量分析についても実施した。これらの結果から主な分解物は、KW-2581 のオキシ誘導体(D-1)、エポキシ誘導体(D-2)であることが推測された。さらに類縁物質標準品との比較より 9, 11-デヒドロ誘導体、加水分解体が同定された。推測された類縁物質については、UV スペクトルの詳細な考察を行い、さらには合成的アプローチによりそれぞれの化合物を合成し、HPLC の相対保持時間、¹³C-NMR による構造比較から推定の通りであることを確認した。さらに大型放射光施設 SPring-8 にて KW-2581 粉末結晶から結晶構造解析を行った。この結晶構造をもとに、これまでに得られた種々のスペクトルの特徴的な性質が分子構造に依存することを明らかにした。

以上述べたように、青木氏は、開発化合物である KW-2581 のジェットミル粉碎で観察された品質低下を構造物性面および粉碎で生じた類縁物質の構造面から検討した。すなわち、物性面では、粉末 X 線回折より粉碎により結晶化度が低下し、同時に吸湿性が增大することを明らかにした。類縁物質の分子構造面からは、エレクトロスプレーイオン化法、インソース衝突誘起解離法、水素重水素交換質量分析などにより主な類縁物質が加水分解体、デヒドロ誘導体、オキシ誘導体、エポキシ誘導体であることを推察するとともに合成手法とスペクトル解析で推察が正し

いことを証明した。さらに放射光施設 **SPring-8** による粉末 X 線結晶構造解析より **KW-2581** の構造を明らかにし、本化合物の特異な物性を分子論的に解明した。これらの結果を総合して、ジェットミル粉砕で生じた分解が、結晶化度の低下と吸湿に加えてジェット気流による衝突で生じたメカノラジカルあるいは容器表面における固相-電子移動反応で生じたラジカルの生成による酸化分解反応であることを明らかにした。

現在、医薬品の品質保証に **ICH** の考えが導入されており、**ICHQ8** の **QbD** アプローチに基づいた工程の理解や品質保証が求められている。青木氏の研究は、まさに粉砕で起きる現象を詳細に検討し、製剤の製造工程の理解を実践したものである。

本テーマに関係する主論文を既に学術論文として公表しており、博士（薬学）に十分に値すると判断する。

2015年2月25日

寺田勝英